

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 14/635, 16/24, G01N 33/78</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/10041</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. April 1996 (04.04.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03757			(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. September 1995 (22.09.95)			
(30) Prioritätsdaten: P 44 34 551.8 28. September 1994 (28.09.94) DE			<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Niedersächsisches Institut für Peptidforschung, Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ADERMANN, Knut [DE/DE]; Schleidenstrasse 5, D-30177 Hannover (DE). HOCK, Dieter [DE/DE]; Weinbergstrasse 14, D-74924 Neckarsbischofsheim (DE). MÄGERLEIN, Markus [DE/DE]; Blumenstrasse 5, D-63785 Obernburg (DE).			
(74) Anwalt: GODEMEYER, Thomas; Hauptstrasse 58, D-51491 Overath (DE).			

(54) Title: PEPTIDES FROM THE hPTH SEQUENCE (1-37)

(54) Bezeichnung: PEPTIDE AUS DER SEQUENZ DES hPTH (1-37)

## (57) Abstract

The invention concerns peptides from the human parathyroid hormone (hPTH) sequence (1-37) and containing  $\alpha$ -helical amino acid sequence regions and/or non-structured amino acid sequence regions. The said peptides are capable of inducing antibodies when injected into animals. The invention also concerns a diagnostic agent and antibodies obtainable by vaccination of animals with the peptides in question.

## (57) Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend  $\alpha$ -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ein Diagnostikum und Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den erfindungsgemäßen Peptiden.

#### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

**Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

<b>AT</b>	Oesterreich	<b>GA</b>	Gabon	<b>MR</b>	Mauretanien
<b>AU</b>	Australien	<b>GB</b>	Vereinigtes Königreich	<b>MW</b>	Malawi
<b>BB</b>	Barbados	<b>GE</b>	Georgien	<b>NE</b>	Niger
<b>BE</b>	Belgien	<b>GN</b>	Guinea	<b>NL</b>	Niederlande
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Griechenland	<b>NO</b>	Norwegen
<b>BG</b>	Bulgarien	<b>HU</b>	Ungarn	<b>NZ</b>	Neuseeland
<b>BJ</b>	Benin	<b>IE</b>	Irland	<b>PL</b>	Polen
<b>BR</b>	Brasilien	<b>IT</b>	Italien	<b>PT</b>	Portugal
<b>BY</b>	Belarus	<b>JP</b>	Japan	<b>RO</b>	Rumänien
<b>CA</b>	Kanada	<b>KE</b>	Kenya	<b>RU</b>	Russische Föderation
<b>CF</b>	Zentrale Afrikanische Republik	<b>KG</b>	Kirgisistan	<b>SD</b>	Sudan
<b>CG</b>	Kongo	<b>KP</b>	Demokratische Volksrepublik Korea	<b>SE</b>	Schweden
<b>CH</b>	Schweiz	<b>KR</b>	Republik Korea	<b>SI</b>	Slowenien
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KZ</b>	Kasachstan	<b>SK</b>	Slowakei
<b>CM</b>	Kamerun	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SN</b>	Senegal
<b>CN</b>	China	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>TD</b>	Tschad
<b>CS</b>	Tschechoslowakei	<b>LU</b>	Luxemburg	<b>TG</b>	Togo
<b>CZ</b>	Tschechische Republik	<b>LV</b>	Lettland	<b>TJ</b>	Tadschikistan
<b>DE</b>	Deutschland	<b>MC</b>	Monaco	<b>TT</b>	Trinidad und Tobago
<b>DK</b>	Dänemark	<b>MD</b>	Republik Moldau	<b>UA</b>	Ukraine
<b>ES</b>	Spanien	<b>MG</b>	Madagaskar	<b>US</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>FI</b>	Finnland	<b>ML</b>	Mali	<b>UZ</b>	Usbekistan
<b>FR</b>	Frankreich	<b>MN</b>	Mongolei	<b>VN</b>	Vietnam

**Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37)**

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide aus der Sequenz  
5 des hPTH (1-37), ein Diagnostikum erhältlich durch Immuni-  
sierung von Tieren mit den Peptiden, Antikörper oder deren  
Fragmente erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den  
Peptiden sowie die Verwendung der Peptide zur Herstellung  
eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktivem h-PTH.

10

Humanes Parathormon (hPTH), ein lineares Polypeptid aus 84  
Aminosäuren, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation  
des Calciumstoffwechsels. Der Metabolismus dieses Hormons  
führt zu einer großen Zahl C-terminaler Fragmente, deren  
15 biologische Funktion noch nicht geklärt ist. Als zirkulie-  
rendes N-terminales Fragment ist das hPTH 1-37 festgelegt  
(EP-A 0 349 545). Dieses Fragment besitzt die volle biologi-  
sche Aktivität des Gesamthormons. Diese nimmt allerdings bei  
Verlust der ersten Aminosäure, Serin, deutlich ab und geht  
20 ohne die ersten beiden Aminosäuren, Serin und Valin, völlig  
verloren.

Für das intakte Hormon hPTH 1-84 und für das N-terminale  
Fragment werden Serumkonzentrationen im Bereich von  
25  $10^{-12}$  mol/l gemessen. Zur Bestimmung solch niedriger Konzen-  
trationen bedient man sich immunologischer Meßverfahren. Die  
validesten Ergebnisse liefern hierbei Meßverfahren nach dem  
Doppelantikörper oder Sandwich Prinzip (z.B. Two-site Radio-  
immunoassay, IRMA oder Sandwich Enzym Linked Immuno-  
30 Sorbent Assay, Sandwich ELISA). Solche Assays sind für hPTH  
1-84 kommerziell erhältlich. Zur Messung von hPTH 1-34 ist  
ein Assay nach dem Doppelantikörper-Prinzip nicht bekannt.

35 Hierfür sind zwei Antikörper notwendig. Diese müssen, um ei-  
ne gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden, Epitope  
des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zu-  
einander liegen. Bei Immunisierung mit dem intakten Antigen  
erhält man ein heterogenes Gemisch unterschiedlicher Anti-

- 2 -

- körper, die für einen Sandwich-Assay erst aufwendig gereinigt werden müssen. Zwar war es bisher möglich aufgrund theoretischer Berechnungen nach B.A. Jameson & H. Wolf, The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS 4, p 181-186, 1988 am N-Terminus eine bevorzugte immunogen wirkende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 7 - 14 festzustellen. Eine Immunisierung mit N-terminalen Fragmenten nach etablierten Methoden führt in erster Linie zu Antikörpern, die, wie für hPTH 1-34 beschrieben (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk und F.P. Armbruster; Characterisation of antibodies against human N-terminal parathyroid hormon by epitope mapping; J. Immunoassay 13 S. 1-13, 1992), in dem Bereich dieser Aminosäuren binden. Diese Antikörper können aber nicht zwischen biologisch aktiven und biologisch inaktiven PTH 1-84 oder Fragmenten davon, denen die ersten beiden Aminosäuren Serin und Valin fehlen, unterscheiden.
- 20 Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, Peptide anzugeben, mit deren Hilfe die oben genannten Nachteile der Diagnose von biologisch aktivem h-PTH beseitigt werden können.
- 25 Das angesprochene technische Problem wird überraschenderweise gelöst durch Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend  $\alpha$ -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Dabei enthalten die Peptide vorzugsweise die N-terminalen  $\alpha$ -Helix im Bereich der Aminosäuren 5-9, einen unstrukturierten Abschnitt der Aminosäuren 10-16 und/oder eine C-terminale  $\alpha$ -Helix im Bereich der Aminosäuresequenz 17-34 des hPTH (1-37). Vorzugsweise werden die folgenden erfindungsgemäßen Peptide zur Immunisierung verwendet:

- 3 -

**hPTH 1-10**

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Met<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-OH (1)

**hPTH 1-9**

5 NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Met<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-OH (2)

**hPTH 1-8**

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Met<sup>8</sup>-OH (3)

10 **hPTH 1-7**

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-OH (4)

**hPTH 1-6**

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-OH (5)

15

**hPTH 1-5**

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-OH (6)

**hPTH 9-18**

20 NH<sub>2</sub>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (7)

**hPTH 10-18**

NH<sub>2</sub>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (8)

25 **hPTH 11-18**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (9)

**hPTH 12-18**

NH<sub>2</sub>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (10)

30

**hPTH 13-18**

NH<sub>2</sub>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (11)

**hPTH 14-18**

35 NH<sub>2</sub>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH (12)

- 4 -

**hPTH 9-17**

NH<sub>2</sub>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-OH (13)

**hPTH 9-16**

5 NH<sub>2</sub>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-OH (14)

**hPTH 9-15**

NH<sub>2</sub>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-OH (15)

10 **hPTH 9-14**

NH<sub>2</sub>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-OH (16)

**hPTH 9-13**

NH<sub>2</sub>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-OH (17)

15 **hPTH 24-37**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-  
Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (18)

**hPTH 25-37**

20 NH<sub>2</sub>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-  
Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (19)

**hPTH 26-37**

25 NH<sub>2</sub>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-  
Leu<sup>37</sup>-OH (20)

**hPTH 27-37**

NH<sub>2</sub>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH  
(21)

30

**hPTH 28-37**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (22)

**hPTH 29-37**

35 NH<sub>2</sub>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (23)

- 5 -

**hPTH 30-37**

NH<sub>2</sub>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (24)

**hPTH 31-37**

5 NH<sub>2</sub>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (25)

**hPTH 32-37**

NH<sub>2</sub>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (26)

10 **hPTH 33-37**

NH<sub>2</sub>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (27)

**hPTH 24-36**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-  
15 Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-OH (28)

**hPTH 24-35**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-  
20 Val<sup>35</sup>-OH (29)

20 **hPTH 24-34**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-OH  
(30)

25 **hPTH 24-33**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-OH (31)

**hPTH 24-32**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-OH (32)

30

**hPTH 24-31**

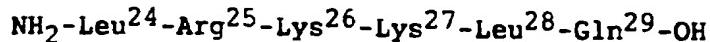
NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-OH (33)

**hPTH 24-30**

35 NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-OH (34)

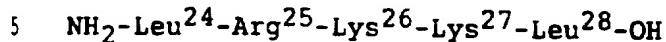
- 6 -

**hPTH 24-29**



(35)

**hPTH 24-28**



(36)

Die genannten Sequenzen repräsentieren in ihrer Primärstruktur wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur, wie sich durch NMR-Daten unterstützend belegen lässt. Voraussetzung  
10 dazu war eine Festlegung der Sekundärstruktur für PTH 1-37  
in physiologischer Lösung.

Die genannten strukturell auffälligen Bereiche wirken gut  
immunogen. Es werden Antikörper gebildet, die an den ersten  
15 Aminosäuren des N-Terminus binden. Bereits das Fehlen von  
zwei Aminosäuren führt zu einem erheblichen Affinitätsver-  
lust. Da diese Aminosäuren zur Ausübung der biologischen  
Wirkung unerlässlich sind, ist es mit dem erfundungsgemäßem  
Peptid möglich Antikörper zu erhalten, die nur hPTH und  
20 Fragmente davon erkennen, die biologisch aktiv sind.

Weiterhin sind Antikörper herstellbar, die den midregionalen  
Bereich 9-15 detektieren, und Antikörper, die C-terminal im  
Bereich der Aminosäuren 30-37 binden. Erfundungsgemäß können  
25 also Antikörper gegen Bereiche des hPTH 1-37 produziert wer-  
den, die aufgrund theoretischer Berechnungen im Gesamtmo-  
kül nicht immunogen wirken. Diese Bereiche liegen zudem so-  
weit auseinander, daß keine sterische Hinderung vorliegt,  
die ein gleichzeitiges Binden zweier Antikörper verhindern  
30 würde.

Die Peptide können in bevorzugten Ausführungsformen am N-  
terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen  
Ende modifiziert sein, und zwar in Form von Acetylierungs-,  
35 Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungs-  
produkten.

- 7 -

Schließlich können erfindungsgemäße Peptide auch an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin etc. gebunden sein. Die Bindung an die Carrierproteine erfolgt vorzugsweise durch  
5 Carbodiimid oder Formaldehyd.

Die erfindungsgemäßen Peptide können verwendet werden, um ein Diagnostikum herzustellen. Das erfindungsgemäße Diagnostikum ist dabei erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der erfindungsgemäßen Peptide. Nach der Immunisierung kann aus den immunisierten Tieren eine Immunoglobulin-Fraktion isoliert werden, die Antikörper-Fraktionen enthält, welche einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der erfindungsgemäßen Peptide aufweisen. Die so erhaltenen Antikörpern sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. In einer alternativen Ausführungsform können neben den vollständigen Antikörpern bestehend aus  $F_{ab}$  und  $F_c$  auch deren Fragmente wie  $F_{ab}$  oder Fragmente der Antikörper verwendet werden, welche die Idiotypen zu den Epitopen der Peptide sind.  
10  
15  
20

Die Peptide gemäß der Erfindung sind zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37) geeignet.

25 Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben:

**Beispiel 1**

30 Festphasensynthese der Peptide:

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Synthese der Peptide beruht auf der Peptidsynthese am festen Träger. Die C-terminale Aminosäure wird jeweils in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid und Dimethylaminopyridin an das Trägermaterial gebunden. Als Trägermaterial für die Synthesen werden Wang-

- 8 -

Harz oder entsprechende Harze eingesetzt.

Folgende L-Aminosäure-Derivate werden für die Synthese der Sequenz, ausgehend vom aufgeführten Peptidyl-Harz, verwendet:  
5 a) hPTH 1-10: Fmoc-Asn(Trt)-Wang-Harz, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Boc-Ser(tBu)-OH. b) hPTH 9-18: Fmoc-Met-Wang-Harz, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Boc-His(Trt)-OH. c) hPTH 24-37: Fmoc-Leu-Wang-Harz, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH.

Die Synthese kann durch in situ-Aktivierung mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) oder dessen Derivaten oder mit Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) oder dessen Derivaten in Gegenwart von Diisopropylethylamin oder N-Methylmorpholin und 1-Hydroxybenzotriazol durchgeführt werden, wobei während der Kupplungen in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon ein vier- bis zehnfacher Überschuß der Fmoc-L-Aminosäure verwendet wird. Die Abspaltungen der Fmoc-Gruppen werden mit 20% Piperidin oder 2% Piperidin und 2% 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Nach der Synthese werden die Harze mit 2-Propanol und Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Abspaltung vom Träger und Entblockierung wird das Peptidyl-Harz 30-90 Minuten bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure, die 5% Scavenger, Wasser, Ethandiol, Phenol oder Thioanisol, enthält, umgesetzt, filtriert, mit Trifluoressigsäure gewaschen und anschließend mit tert-Butylmethylet-

- 9 -

her ausgefällt. Der Niederschlag wird aus wässriger Lösung lyophilisiert.

5

### Beispiel 2

#### Reinigung und Analyse

10 Die Reinigung der Rohprodukte erfolgt chromatographisch über eine C18-Reverse-Phase-Säule (10µm, Puffer A: 0,01 N HCl in Wasser; Puffer B: 20% Isopropanol, 30 % Methanol, 50% Wasser, 0,01 N HCl; Gradient: 10-80% in 60 Minuten; Detektion 230 nm).

15

Die Reinheit der Produkte wird durch Massenspektrometrie und C18-Reverse-Phase-Chromatographie bestimmt.

20 Beispiel 3

#### Kopplung an Carrierprotein

25 Als Carrierprotein werden Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinder-serumalbumin, Ovalbumin oder Mausserumalbumin verwendet. Die Kopplung erfolgt nach der Carbodiimid-Methode über Carboxylgruppen des Peptides. Das Peptid wird in wässriger Lösung durch 5 minütige Umsetzung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimid-Hydrochlorid aktiviert. Die Kopplung  
30 erfolgt durch Zugabe des aktivierten Peptides zu einer wässrigen Lösung des Carriers. Das molare Verhältnis beträgt 1 Peptid auf 50 Aminosäuren des Carrierproteins. Die Umsetzung dauert 4 Stunden.

35 Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumacetat in einer Endkonzentration von 100 mM gestoppt. Man lässt eine Stunde inkubieren.

- 10 -

Die Abtrennung des Protein-Peptid Konjugates vom Peptid erfolgt durch wiederholte Dialyse gegen 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2.

5

**Beispiel 4**

Synthese der Multiple Antigenic Peptides (MAP)

- 10 Die dreifache Lysin-Verzweigung wird erreicht, indem an C-terminales Alanin , gebunden an Wang-Harz, in drei Kupplungszyklen jeweils Fmoc-L-Lysin(Fmoc)-OH gebunden wird. Durch Abspaltung mit Piperidin werden danach acht freie Aminofunktionen erhalten, an denen die Sequenzen des humanen  
15 Parathormons nach obiger Beschreibung synthetisiert werden.

**Beispiel 5**

20 Immunisierung

- Für die Erstimmunisierung werden pro kg Körpergewicht des zu immunisierenden Tieres 125 µg des Carrier-Peptid Konjugates bzw. MAP in 250 ml Wasser gelöst und mit 250 µl kompletten  
25 Freund'schen Adjuvans emulgiert. Die Emulsion wird über den Rücken verteilt in 10 Portionen s.c. appliziert.

- Das Boostern erfolgt nach 2-4 Wochen analog. Hierbei wird lediglich das komplette Freund'sche Adjuvans durch inkomplettes Freund'sches Adjuvans ersetzt.  
30

- 11 -

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5    1. Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend  $\alpha$ -helical Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen.
- 10    2. Peptide nach Anspruch 1 aus hPTH (1-37) mit der Sequenz

hPTH 1-10

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Met<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-OH      (1)

15    hPTH 1-9

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Met<sup>8</sup>-His<sup>9</sup>-OH      (2)

hPTH 1-8

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-Met<sup>8</sup>-OH      (3)

20

hPTH 1-7

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup>-OH      (4)

hPTH 1-6

25    NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-OH      (5)

hPTH 1-5

NH<sub>2</sub>-Ser<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Ser<sup>3</sup>-Glu<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-OH      (6)

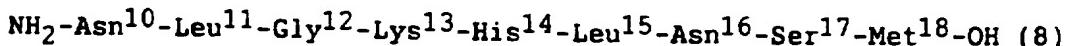
30

hPTH 9-18

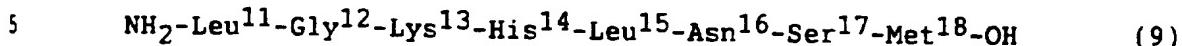
NH<sub>2</sub>-His<sup>9</sup>-Asn<sup>10</sup>-Leu<sup>11</sup>-Gly<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-His<sup>14</sup>-Leu<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Met<sup>18</sup>-OH      (7)

- 12 -

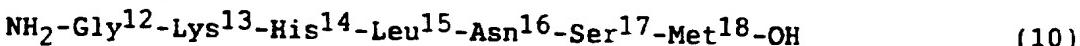
**hPTH 10-18**



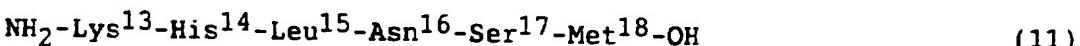
**hPTH 11-18**



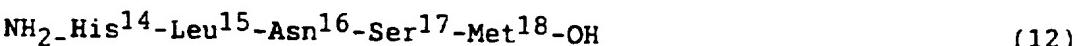
**hPTH 12-18**



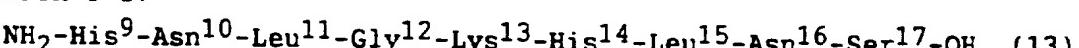
10     **hPTH 13-18**



**hPTH 14-18**



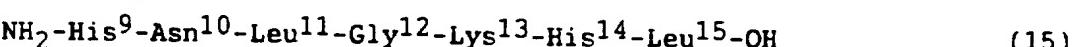
**hPTH 9-17**



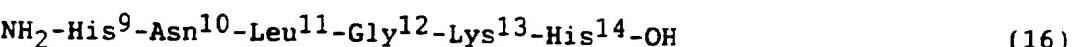
**hPTH 9-16**



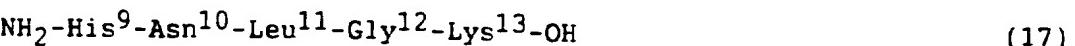
**hPTH 9-15**



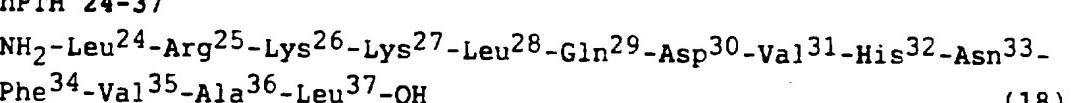
25     **hPTH 9-14**



**hPTH 9-13**



**hPTH 24-37**



- 13 -

**hPTH 25-37**

NH<sub>2</sub>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-  
Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (19)

**hPTH 26-37**

NH<sub>2</sub>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-  
Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (20)

**hPTH 27-37**

NH<sub>2</sub>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-  
Leu<sup>37</sup>-OH (21)

**hPTH 28-37**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-  
OH (22)

**hPTH 29-37**

NH<sub>2</sub>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (23)

**hPTH 30-37**

NH<sub>2</sub>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (24)

**hPTH 31-37**

NH<sub>2</sub>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (25)

**hPTH 32-37**

NH<sub>2</sub>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (26)

**hPTH 33-37**

NH<sub>2</sub>-Asn<sup>33</sup>-Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-Leu<sup>37</sup>-OH (27)

**hPTH 24-36**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-  
Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Ala<sup>36</sup>-OH (28)

- 14 -

**hPTH 24-35**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-  
Phe<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-OH

(29)

5

**hPTH 24-34**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-  
Phe<sup>34</sup>-OH

(30)

10

**hPTH 24-33**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-Asn<sup>33</sup>-  
OH

(31)

**hPTH 24-32**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-His<sup>32</sup>-OH

(32)

**hPTH 24-31**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-Val<sup>31</sup>-OH

(33)

20

**hPTH 24-30**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-Asp<sup>30</sup>-OH

(34)

**hPTH 24-29**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>-OH

(35)

25

**hPTH 24-28**

NH<sub>2</sub>-Leu<sup>24</sup>-Arg<sup>25</sup>-Lys<sup>26</sup>-Lys<sup>27</sup>-Leu<sup>28</sup>-OH

(36)

3. Peptide nach Anspruch 1 und/oder 2, die am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten, und/oder gebunden sind an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin.

- 15 -

4. Diagnostikum, erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, Gewinnung von Immunoglobulinen enthaltenden Fraktionen aus den immunisierten Tieren und Isolierung von Fraktionen, die einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 aufweisen und das gegebenenfalls weiter Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthält.
5. Antikörper oder Fragmente von Antikörpern erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit mindestens einem Peptid nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3.
10. Verwendung der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 95/03757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K14/635 C07K16/24 G01N33/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 03201 (HILLIKER SANDRA R) 17 February 1994 see claims; example 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, 24 May 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594, NAKAMURA, RYUICHI ET AL 'Action of fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' see abstract & ENDOCRINOL. JPN. (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE; ISSN: 0013-7219, 1981 --- -/-	1,2

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 1996

Date of mailing of the international search report

26. 01. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/03757

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 5, 1 February 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 29060, NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL 'Monoclonal antibodies directed against the biologically active region of parathyroid hormone' see abstract & MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES. (1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT E.; EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN, NEW YORK, N. Y. CODEN: 46PAAZ, 1981 ---	1,2,4-6
X	JOURNAL OF IMMUNOASSAY, vol. 13, no. 1, 1992 NEW YORK, US, pages 1-13, J. TAMPE ET AL. 'Characterization of Antibodies against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping' cited in the application see page 2, paragraph 2 see page 4, paragraph 1 see results and discussion of the pages 5-12; ---	1-6
X	J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981), 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565, 1981 PANG, PETER K. T. ET AL 'Hypotensive action of synthetic fragments of parathyroid hormone' see page 567, right column, paragraph 2 see page 568, right column, paragraph 5; figure 1; table 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17, 26 October 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of parathyroid hormone and related polypeptides on the heart and coronary circulation of dogs' see abstract & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981 ---	1,2
X	FR,A,2 550 204 (TOYO JOZO KK) 8 February 1985 see fragment 10 of page 25 and fragment 40 of page 50. -	1-3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 95/03757

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. Wingender et al. 'Structure-Function Relationship in Parathyroid Hormone' in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176, see page 169, paragraph 3 ---	1
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, vol. 208, 1986 NEW YORK, US, pages 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo' see figure 1 ---	1
X	WO,A,91 06564 (FORSSMANN WOLF GEORG) 16 May 1991 see page 5, paragraph 3; claims 1-5,14 ---	1,3-6
A	DE,A,33 47 548 (JUEPPNER HARALD WERNER DR MED;HESCH ROLF DIETER) 11 July 1985 see claims; examples -----	1,4-6

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No	
PCT/EP 95/03757	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9403201	17-02-94	CA-A- EP-A-	2141588 0656784	17-02-94 14-06-95
FR-A-2550204	08-02-85	JP-C- JP-B- JP-A- JP-A- DE-A- US-A-	1684818 3052479 60034996 61024598 3428942 4656250	31-07-92 12-08-91 22-02-85 03-02-86 28-02-85 07-04-87
WO-A-9106564	16-05-91	DE-A- AT-T- AU-B- AU-B- CA-A- DE-D- EP-A- ES-T-	3935738 121424 643725 6871291 2071538 59008949 0497915 2071837	08-05-91 15-05-95 25-11-93 31-05-91 28-04-91 24-05-95 12-08-92 01-07-95
DE-A-3347548	11-07-85	NONE		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 95/03757

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 C07K14/635 C07K16/24 G01N33/78

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 6 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,94 03201 (HILLIKER SANDRA R) 17.Februar 1994 siehe Ansprüche; Beispiel 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, 24.Mai 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594, NAKAMURA, RYUICHI ET AL 'Action of fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' siehe Zusammenfassung & ENDOCRINOL. JPN. (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE; ISSN: 0013-7219, 1981 --- -/-	1,2

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
10.Januar 1996	26.01.96
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Fuhr, C

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 95/03757

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 5, 1.Februar 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 29060, NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL 'Monoclonal antibodies directed against the biologically active region of parathyroid hormone' siehe Zusammenfassung & MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES. (1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT E.; EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN, NEW YORK, N. Y. CODEN: 46PAAZ, 1981 ---	1,2,4-6
X	JOURNAL OF IMMUNOASSAY, Bd. 13, Nr. 1, 1992 NEW YORK, US, Seiten 1-13, J. TAMPE ET AL. 'Characterization of Antibodies against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2, Absatz 2 siehe Seite 4, Absatz 1 siehe 'results' und 'discussion' auf den Seiten 5-12 ---	1-6
X	J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981), 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565, 1981 PANG, PETER K. T. ET AL 'Hypotensive action of synthetic fragments of parathyroid hormone' siehe Seite 567, rechte Spalte, Absatz 2 siehe Seite 568, rechte Spalte, Absatz 5; Abbildung 1; Tabelle 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17, 26.Oktober 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of parathyroid hormone and related polypeptides on the heart and coronary circulation of dogs' siehe Zusammenfassung & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981 ---	1,2
X	FR,A,2 550 204 (TOYO JOZO KK) 8.Februar 1985 siehe Fragment 10 auf Seite 25 und Fragment 40 auf Seite 50 ---	1-3

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 95/03757

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	E. Wingender et al. 'Structure-Function Relationship in Parathyroid Hormone' in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176, siehe Seite 169, Absatz 3 ---	1
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, Bd. 208, 1986 NEW YORK, US, Seiten 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo' siehe Abbildung 1 ---	1
X	WO,A,91 06564 (FORSSMANN WOLF GEORG) 16.Mai 1991 siehe Seite 5, Absatz 3; Ansprüche 1-5,14 ----	1,3-6
A	DE,A,33 47 548 (JUEPPNER HARALD WERNER DR MED;HESCH ROLF DIETER) 11.Juli 1985 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1,4-6

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03757

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9403201	17-02-94	CA-A- EP-A-	2141588 0656784	17-02-94 14-06-95
FR-A-2550204	08-02-85	JP-C- JP-B- JP-A- JP-A- DE-A- US-A-	1684818 3052479 60034996 61024598 3428942 4656250	31-07-92 12-08-91 22-02-85 03-02-86 28-02-85 07-04-87
WO-A-9106564	16-05-91	DE-A- AT-T- AU-B- AU-B- CA-A- DE-D- EP-A- ES-T-	3935738 121424 643725 6871291 2071538 59008949 0497915 2071837	08-05-91 15-05-95 25-11-93 31-05-91 28-04-91 24-05-95 12-08-92 01-07-95
DE-A-3347548	11-07-85	KEINE		